动 物 学 研 究 2012，Aug. 33(4): 389−394 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.04389

文昌鱼 *tropomyosin* 基因的克隆、进化分析及其胚胎发育与成体中的表达模式

李忻怡[1,2,*]，林浴霜[2]，张红卫[2]

(1. 陕西师范大学 生命科学学院，西安 710062; 2. 山东大学 生命科学学院，济南 250100)

摘要： Tropomyosin 是一种分布广泛而且在进化上十分保守的蛋白，是肌肉形成和收缩过程中重要的调节蛋白质。通过 RT-PCR 和 RACE 技术得到文昌鱼 *tropomyosin* 基因全长，编码一个含 284 个氨基酸残基的蛋白质，将文昌鱼 Tropomyosin 和在其他物种中的同源物进行比对建树，发现其在功能域上高度保守并且只有一个拷贝，符合动物分类学中各物种的进化地位。胚胎整体原位杂交实验得知，*tropomyosin* 在文昌鱼早期发育的表达，最早从原肠胚末期神经胚早期开始，定位于分化中的中内胚层。到神经胚期，*tropomyosin* 的表达出现在发育中的体节和脊索中。随着发育的进行，*tropomyosin* 的表达稳定地集中在体节、脊索处。到 72 h 幼虫阶段，*tropomyosin* 的表达仍然在肌节内。成体的切片原位杂交结果显示，*tropomyosin* 在肌节中的表达大幅度下调，而在神经管细胞、脊索和腮区腮瓣处仍然可以检测到明显的表达，在外胚层和表皮内没有发现杂交信号。研究结果表明，*tropomyosin* 的表达与文昌鱼肌节、肌肉以及神经索的发生相关，参与文昌鱼胚胎躯体模式的构建，而且在成体的生命活动中发挥重要作用。

关键词： 文昌鱼；进化分析；胚胎发育；表达图式；Tropomyosin
中图分类号： Q959.287; Q344.13; Q951 **文献标志码：** A **文章编号：** 0254-5853-(2012)04-0389-06

Phylogenetic analysis and expression patterns of *tropomyosin* in amphioxus

LI Xin-Yi[1,2,*], LIN Yu-Shuang[2], ZHANG Hong-Wei[2]

(1. *Life Science College*, *Shaanxi Normal University*, *Xi'an* 710062, *China*; 2. *Life Science College*, *Shandong University*, *Ji'nan* 250100, *China*)

Abstract: In amphioxus, we found a mesoderm related gene, *tropomyosin*, which encodes a protein comprising 284 amino acid residues, sharing high identities with other known Tropomyosin proteins both in vertebrates and invertebrates. Phylogenetically, amphioxus Tropomyosin fell outside the invertebrate clade and was at the base of the vertebrate protein family clade, indicating that it may represent an independent branch. From the early neurula to the larva stage, whole-mount in situ hybridization and histological sections found transcripts of amphioxus *tropomyosin* gene. Weak tropomyosin expression was first detected in the wall of the archenteron at about 10 hours-post-fertilization neurula stage, while intense expression was revealed in the differentiating presumptive notochord and the muscle. Transcripts of *tropomyosin* were then expressed in the formed notochord and somites. Gene expression seemed to continue in these developing organs throughout the neurular stages and remained till 72-hours, during the early larval stages. In situ study still showed *tropomyosin* was also expressed in the neural tube, hepatic diverticulum, notochord and the spaces between myotomes in adult amphioxus. Our results indicated that *tropomyosin* may play an important role in both embryonic development and adult life.

Key words: Amphioxus; Phylogenetic analysis; Embryogenesis; Expression pattern; Tropomyosin

肌肉是脊椎动物胚胎发育中最早出现的组织之一。研究肌肉的发生机制是了解胚胎发育中细胞命运的决定、分化及器官形成的重要途径。研究文昌鱼肌肉发育过程，有助于阐明脊椎动物肌肉发生

收稿日期：2012-01-06；接受日期：2012-06-13
基金项目：国家自然科学基金资助项目(30700434)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: lixinyi@snnu.edu.cn

的机制。

从胚胎发育过程来看文昌鱼具有和脊椎动物一样的分节过程。原肠运动后，脊椎动物 (爪蛙除外) 胚胎的肌肉发生也是从位于脊索两侧的近轴中胚层按从前到后的顺序分节 (segmentation)、成团，逐渐形成一定数目的体节 (somites)，再由体节分化出3种不同的组织：生骨节、生肌节、生皮节，将来分别生成骨骼、肌肉以及真皮和结缔组织 (Mei & Ding,1999)。

从分子水平上看，有相同的基因和蛋白参与了文昌鱼和脊椎动物的肌肉发育过程，如碱性肌球蛋白轻链和肌动蛋白不仅存在于脊椎动物中，也同样存在于文昌鱼中 (Holland, 1995; Kusakabe, 1997)。MyoD、Myf5、肌细胞生成素 (myogenin) 和 MRF4 是控制脊椎动物肌肉细胞决定和分化的关键因子 (Braun et al, 1989; Davis et al, 1987; Simon & Konieczny, 1989; Wright et al, 1989; Yun, 1996)，能激活一系列肌肉专一因子的表达，从而促使细胞向肌细胞方向分化。作为一种最接近脊椎动物的头索动物，文昌鱼在其基因组中有两个生肌 bHLH 基因片段 (Araki, 1994, 1996; Beach, 1999; Meedel, 1997)。对两个文昌鱼 MyoD 基因家族基因 *AmphiMRF1* 和 *AmphiMRF2* 进行转录表达研究发现两者最初均在近轴中胚层中表达，其中 *AmphiMRF1* 的表达时间比 *AmphiMRF2* 稍晚 (Schubert et al, 2003)。

脊索是脊椎动物门胚胎的一个中轴性结构。在较高等的脊椎动物中，脊索是一个瞬时存在的结构，它定位于胚胎的中间，与背腹轴与左右的轴极性形成相关。脊索产生一些分泌因子，给其周围的组织以信号，提供其定位和命运分化的信息 (Christ et al, 2004; Danos & Yost, 1995; Fouquet et al, 1997; Goldstein & Fishman, 1998; Lohr et al, 1997; Munsterberg & Lassar, 1995; Pourquié et al, 1993; Yamada et al, 1991, 1993)。作为一个组织，脊索和软骨的结构很接近，看起来近似软骨的原始形式。因此，脊索一直支撑胚胎结构直至其他组织的形成；而在一些脊椎动物的进化分支上，比如无颚类脊椎动物 (七鳃鳗)、远古鱼类 (sturgeon 鲟鱼) 等，脊索在一生中都存在。在较高等脊椎动物中，脊索在椎骨中骨化，对椎骨之间的集中起作用，存在于称之为 nucleus pulposis 的结构中。

肌肉的收缩是通过细胞内 Ca 离子浓度来调节的。在脊椎动物中的调节机制，肌肉的收缩是通过细胞内 Ca 离子浓度来调节的。在脊椎动物中的调节机制是可以分为 actin 调节和 myosin 调节的。条纹肌的收缩主要是通过 actin 调节，而平滑肌的收缩主要是通过 myosin 调节。Tropomyosin 的作用是调节 actin－myosin 的相互作用并且使 actin 的结构得到稳定，但其潜在的生化机制并不是很清楚。

现在发现在心肌肌肉的发育与功能的行使中，Tropomyosin 也起着很重要的作用 (Steven et al, 2003)。心肌细胞的激活状态中, Tropomyosin 起着重要的作用。在人类条纹肌中发现的主要的 tropomyosin 蛋白形式是 α -Tropomyosin, β -Tropomyosin 和α-慢肌 Tropomyosin 。在小鼠模型中, α-形式过表达到大概整个 Tropomyosin 50%的水平时，会引起心率加快和对于 Ca 离子敏感度的降低 (Pieples et al, 2002)。然而，Tropomyosin 的各种异构形式在心肌以及肌肉、脊索中的具体机制仍然不清楚，需要进一步研究确认。

为了适应真核细胞内与肌动蛋白细肌丝相关的多种功能, Tropomyosin 存在有大量的异构体，其中 20 余种已被确认。这些 Tropomyosin 异构体分别由可变的启动子和 RNA 序列所表达，具有共同的结构形式。许多同源体在分布上具有组织和肌丝特异性，意味着被表达的外显子和其代表的分子区域对其相关肌丝的功能具有重要意义。这些基因的突变将引发各种肌病，因此，Tropomyosin 的分子生物学研究具有重要的临床意义。

在文昌鱼中，除了文昌鱼基因组测序信息之外，目前尚无关于 Tropomyosin 的报道。鉴于文昌鱼的特殊进化地位，本研究对青岛文昌鱼 *tropomyosin* 基因演译的蛋白序列进行相似性、同源性和进化分析,并对该基因在胚胎发育不同时期和成体的部分组织的表达进行系统分析，为进一步研究文昌鱼体节肌肉的形成和脊索的功能奠定了一定的基础。通过本研究,我们可以确定文昌鱼 *tropomyosin* 基因在文昌鱼胚胎发育中可能的功能，这将有助于阐明文昌鱼胚胎发育的分子机制和肌肉分化的相关机制，并对心肌的发育与功能以及进化的研究提供资料。

1 材料和方法

1.1 文昌鱼的采集及胚胎的收集

中国青岛文昌鱼 (*Branchiostoma japonicum*)

性成熟个体采集于青岛附近沙子口海域和北海海域。实验室内人工养殖，自然排精排卵并受精,胚胎置于过滤海水中, 25 ℃正常发育。按照不同的发育时期,取其胚胎及幼虫，一部分用 4%多聚甲醛(4%多聚甲醛，用 0.1 mol/L 的 MOPS(pH7.5)配制，含 1 mmol/L EGTA, 0.5 mol/L NaCI)室温固定 1 h 或 4 ℃过夜固定后，梯度酒精脱水至 70% (DEPC 水配制), −20 ℃保存；另一部分离心收集后迅速加入裂解液裂解，提取 RNA 备用。RNA 可用于建库或反转录为 cDNA 作为基因克隆模板。

1.2　RT–PCR 扩增文昌鱼 tropomyosin 片段

设计了扩增文昌鱼 *tropomyosin* 基因的引物。P1：5'-*CGATTCCGTGATTGACTC*-3'; P2：5'-*TCCTTGCTCTCTCGCTCT*-3'。通过 RT-PCR 的方法得到阳性片段，插入克隆质粒，筛选出阳性克隆，由华大公司对质粒进行测序。按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit(Clontech Laboratories, Inc.)试剂盒说明，基于测序所得 *tropomyosin* 序列设计引物，5'-*GCAAGGAAGGTGCTGAGTAACGAGG*-3', 用于扩增该基因的 3'末端，随后进行 PCR 扩增，将获得的序列连入 pGEM-T-Vector(Promega)并测序，最后用 Contig 软件进行序列拼接得到完整的 3'末端，得到 *tropomyosin* 基因的全长序列。

1.3　序列相似性比较及系统进化学分析

以文昌鱼 *tropomyosin* 基因推测的氨基酸全序列构建进化树，利用在线分析工具 NCBI-blastx，从 NCBI 的 GenBank 中检索获得各个物种的 *tropomyosin* 同源序列，利用 Clustalx 1.8 软件对这些序列进行比对及序列相似性分析。用 Tree-puzzle 5.2 以最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统进化树，并利用 TreeView (Win32)软件显示构建好的进化树。

1.4　文昌鱼胚胎和幼体的原位杂交和成体的切片原位杂交

用本实验室已报道的方法标记正义和反义探针(Liang et al, 2004)。探针长度大约在 700 bp~1 kb 之间。选择固定的文昌鱼胚胎和幼体，每个时期 40 个，未孵出的胚胎预先剥去受精膜。根据(Zhang & Mao, 2009)所采用的办法，以获得的中国文昌鱼 *tropomyosin* 片段为模板合成探针，用正义探针杂交结果作为实验对照。对文昌鱼早期发育各时期的胚胎和幼体进行原位杂交、常规石蜡切片，曙红复染，光镜观察照相。

2　结果与分析

2.1　文昌鱼 *tropomyosin* 基因的克隆

利用设计的 1 对引物，经 RT-PCR 扩增后得到 1 段 520 bp 含有 5'开放阅读框的序列。根据获得的序列设计引物，通过 3'RACE 扩增得到该基因的 3'端，经过拼接，得到文昌鱼 *tropomyosin* 的完整开放阅读框的 cDNA 核苷酸序列，全长 1210 bp。此阅读框在 81 位核苷酸处有一起始密码子 ATG，位于典型的 kozak 结构中 (Kozak,1986)，在 932 位核苷酸处有一终止密码子 TAA，编码一个 284 个氨基酸残基组成的蛋白质。通过与 ncbi 的 Genbank 中的数据进行比对，发现我们克隆得到的序列与基因组整体测序所得到的白氏文昌鱼的 *tropomyosin* 基因的序列(GenBank 登录号 GI:8439520) (Suzuki & Satoh, 2000)相同。

2.2　文昌鱼 tropomyosin 系统进化的分析

推测得到的 Tropomyosin 蛋白与其他物种的 Tropomyosin 蛋白之间均存在一定的同源性 (图 1)。与佛罗里达文昌鱼 Tropomyosin 氨基酸的一致性最高为 92%；与爪蛙 (*Xenopus laevis*) 和墨西哥钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*) Tropomyosin 氨基酸的一致性为 70%；与旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*) 的一致性是 58%，与其他脊椎动物斑马鱼 (*Danio rerio*)、鸡 (*Gallus*、*gallus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 氨基酸的一致性分别为 68%、68%、69%和 69%。

同源蛋白比对结果见图 1，图中的除白色区均是高保守区，这些区域恰好和 Tropomyosin 蛋白结构域重合，由此可以看到 Tropomyosin 蛋白在功能域的进化上是高度保守的。从进化树中可见，Tropomyosin 的进化规律符合动物分类学中各物种的进化地位 (图 2)。青岛文昌鱼和乌贼 (*Sepia esculenta*)以及旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*) 在进化上非常接近，并且目前的研究表明均只有一个拷贝，它们很可能歧化于脊椎动物基因出现基因倍增之前。

2.3　文昌鱼 *tropomyosin* 基因的表达模式分析

用原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)的方法，检测 *tropomyosin* 在各胚胎发育时期以及成体中的表达特异性,结果见图 3。在卵裂期和囊胚期均未发现文昌鱼 *tropomyosin* 表达，在原肠胚晚期神经胚早期开始表达，转录产物存在于内中胚层，随着

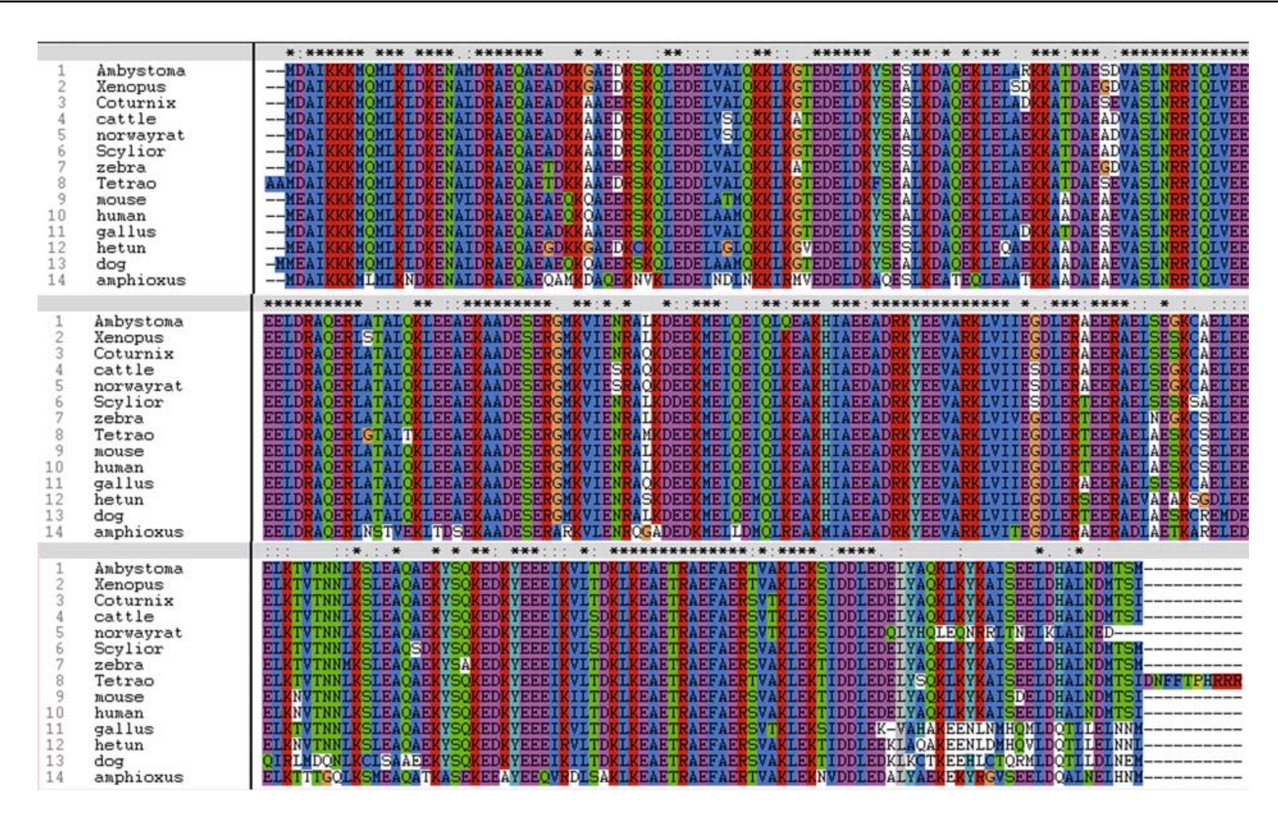


图 1　文昌鱼 Tropomyosin 的同源性比较

Fig. 1　Sequence alignment analysis of amphioxus Tropomyosin

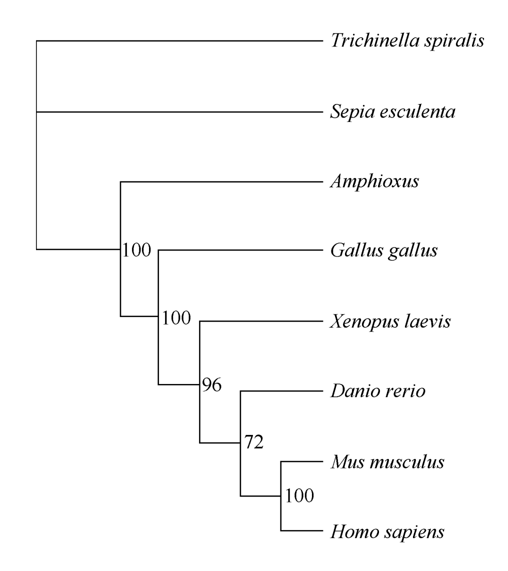


图 2　文昌鱼 Tropomyosin 蛋白的系统发生分析树

Fig. 2　Phylogenetic tree of the Tropomyosin

以旋毛性线虫同源性蛋白为外群，各蛋白序列均取自 Genbank，分别为旋毛形线虫(AAL14704)、乌贼(BAE54429)、鸡(AAA48580.1)、爪蛙(NP_001128548.1)、斑马鱼(CAI11496.1)和人(NP_689476.2)。

Sequences were extracted from NCBI and aligned using the CLUSTALX. Neighbor-joining tree was constructed using sequence 1-240 from the alignment in Fig.4 and 1 000 bootstrap replicates with the treepuzzle program. The Suberites domuncula Tropomyosin was used as out-group. Numbers were bootstrap percentage.

早期胚胎的发育，可以在近轴中胚层中观察到 *tropomyosin* 较强的表达。从文昌鱼胚胎的背面观可以看到在身体的前后轴中线的两侧发育中的肌节和体节中有着强表达。由于左右体节和肌节的不对称(Conklin, 1932)，使表达区域从背面看起来也是不对称的。随着发育的进行转录产物逐渐向后延伸，但是在已形成的肌节中仍然保持表达。从纵切面上可以看到，肌节的着色主要位于肌节之间的分隔处。在神经外胚层和神经管中并未发现 *tropomyosin* 转录产物的表达。48 h 的幼虫中也能检测到 *tropomyosin* 在尾芽中的表达，同时该基因也仍然在已经形成和正在发育过程中的肌节和体节中表达。幼虫期的文昌鱼中检测到了 *tropomyosin* 在已形成肌节中的表达。胚胎切片显示，*tropomyosin* 在肌节和脊索中均有表达。成体切片原位杂交表明，*tropomyosin* 在脊索和神经索中仍然有表达，并且在肌肉的间隔中有微弱表达，同时我们发现，在腮区的腮瓣处 *tropomyosin* 有较强表达。

3　讨　论

文昌鱼 *tropomyosin* 基因编码氨基酸序列与其

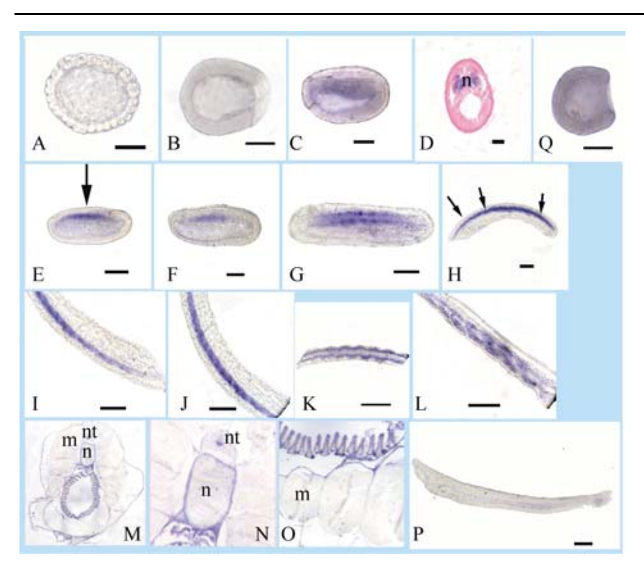


图 3　文昌鱼不同发育时期 *tropomyosin* 的整封原位杂交、切片原位杂交及其组织学切片

Fig. 3　*Tropomyosin* expression in amphioxus embryos, larvae and adults detected by whole mount *in situ* hybridization followed by sectioning

A）囊胚期；B）原肠胚晚期, A、B 中没有发现 *tropomyosin* 的表达；C－G）神经胚期; D）E 的横切面; H）幼虫期 ；I－L）H 的局部放大, 可以看出肌节的不对称发育; M－O）示 *tropomyosin* 在文昌鱼成体中的表达。n－notochord 脊索, nt－nerve tube 神经管, m－muscle; N－显示神经管和脊索处的表达; O－显示肌间隔处和腮的表达。P-Q 为 *tropomyosin* 正义探针的杂交图作为阴性对照。整体原位杂交图除个别说明外均为侧面观, 左侧为前端, 上方为背侧, 比例尺代表 100 μm。切片均为横切面, 上方为背侧, 比例尺代表 50 μm。

For side views of whole mounts (A, B, C, E, F, G, H, I, J, K and L), the anterior is to the left and dorsal is up. Cross-section was counterstained pink and viewed from posterior to the animal. (D, M and O) (A) blastula; (B) late gastrula; (C−G) neurula ,(D) cross-section of (E); (H) larvae; (I−L) detail view of (H), showing asymmetric development of somites; (M–O) adult; (P−Q) negative control. Scale bars, 50 μm of cross-section and 100 μm of whole mounts.

他物种的同源分子一致性非常高, 不论是与较低等的无脊椎动物果蝇或者海胆, 还是与脊椎动物比较, 其一致性都在 64%以上, 即使是与人类的 *tropomyosin* 其一致性也达到了 69%。另外, 文昌鱼 *tropomyosin* 序列还包含有一个 Tropomyosin 的结构域,该结构域是 Tropomyosin 蛋白序列特有的。在该结构域内氨基酸的一致性更高。序列的一致性及其保守结构域的存在说明该基因的功能在进化过程中非常保守, 承担着比较大的进化压力。另外, 进化树显示文昌鱼 Tropomyosin 与其脊椎动物同源蛋白不属于同一姐妹群, 其分支位于脊椎动物分支的基部, 这与文昌鱼的进化地位一致, 即文昌鱼是无脊椎动物向脊椎动物过渡的头索动物类型。同时也为文昌鱼 Tropomyosin 歧化于脊椎动物出现基因大规模倍增之前这一理论提供了新的论据。

在海鞘这样的脊索动物中, 脊索存在于胚胎期和可以自由游泳的幼虫期, 提供了运动所需要的轴向支持 (Satoh, 2003)。与其类似, 在头索动物中脊索对于运动也是必须的, 而且存在于整个生命时期(Holland et al, 2004)。在脊索 cDNA 文库里面的 EST 序列分析发现, 有 11%的 mRNA 是肌肉相关基因。文昌鱼成体脊索里面充满了肌丝来维持它的功能, 而肌丝的功能是由肌肉相关基因的活化表达维持的。现在的研究表明, 大概一般以上的文昌鱼肌肉相关基因都在文昌鱼的脊索细胞中表达, 这些肌肉相关基因也都是脊椎动物肌肉收缩的相关基因。Tropomyosin 是肌肉收缩过程中重要的调节蛋白质, 其最重要的特性是能与肌动蛋白相结合,使肌动蛋白稳定于聚合状态,影响并调控肌动蛋白之间的相互作用,从而在调节细胞能动性、细胞质移动和诱导内皮细胞凋亡等方面起着重要作用。文昌鱼 Tropomyosin 在发育的胚胎中集中在肌节和脊索处, 胚胎时期的时空表达模式证实了文昌鱼胚胎发育时期的脊索的形成以及肌节与肌肉的发生中 *tropomyosin* 起着重要的作用, 但是到了成体, 在神经管细胞和脊索处仍然可以检测到表达的明显存在。这一现象证明文昌鱼成体中 Tropomyosin 可能和神经纤维的收缩有着密切的关系。Tropomyosin 在细肌丝中与肌动蛋白(actin)双螺旋并行存在,可影响并调控肌动球蛋白之间的相互作用, 调节肌肉收缩过程。在成体肌节中和脊索中 *tropomyosin* 的同时表达, 而在肌间隔中的表达相对比较微弱, 我们推测文昌鱼肌肉的收缩能力并不是很强, 脊索和肌节可能同时参与文昌鱼的个体运动。

我们在文昌鱼成体腮区的腮瓣处检测到了 *tropomyosin* 较强的表达, Huang(2007)对文昌鱼的系统解剖学研究发现, 文昌鱼的腮中含有大量的淋巴样细胞, 且这些细胞在感染后体积增大。进一步对文昌鱼进行比较基因组学研究发现，一些与淋巴细胞发育和分化密切相关的基因, 这些基因在文昌鱼被感染后表达明显上调, 原位杂交结果显示，这些基因的表达部位主要位于鳃。这说明原始的适应性免疫可能起源于文昌鱼。同时, 有证据提出在文昌鱼免疫防御过程中, 其表皮、腮和肠道上皮可能起重要作用(Lin et al, 2011)。而 *tropomyosin* 在成体的腮裂处有较强的表达, 但是在无脊椎动物中, Tropomyosin 有着一定的免疫原性，而其在脊椎动

物中并不存在免疫原性, Tropomyosin 的作用在从无脊椎动物到脊椎动物的进化过程中是如何演变的, 在文昌鱼中 Tropomyosin 是否只参与腮裂处的纤毛摆动还是也在免疫防御过程中起作用, 仍需进一步研究验证, 对于其表达调控的机制也有待深入。

参考文献:

Araki I, Saiga H, Makabe KW, Satoh N. 1994. Expression of AMD1, a gene for a MyoD1-related factor in the ascidian *Halocynthia roretzi* [J]. *Roux's Arch Dev Biol,* **203**(6): 320-327.

Araki I, Terazawa K, Satoh N. 1996. Duplication of an amphioxus myogenic *bHLH* gene is independent of vertebrate myogenic *bHLH* gene duplication [J]. *Gene,* **171**(2): 231-236.

Beach RL, Seo P, Venuti JM. 1999. Expression of the sea urchin MyoD homologue, SUM1, is not restricted to the myogenic lineage during embryogenesis [J]. *Mech Dev,* **86**(1-2): 209-212.

Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts [J]. *EMBO J,* **8**(3): 701-709.

Christ B, Huang RJ, Scaal M. 2004. Formation and differentiation of the avian sclerotome [J]. *Anat Embryol : Berl,* **208**(5): 333-350.

Conklin EG. 1932. The embryology of amphioxus [J]. ***J. Morphol.*** 54, 69-151.

Danos MC, Yost HJ. 1995. Linkage of cardiac left-right asymmetry and dorsal-anterior development in *Xenopus* [J]. *Development,* **121**(5): 1467-1474.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts [J]. *Cell,* **51**(6): 987-1000.

Fouquet B, Weinstein BM, Serluca FC, Fishman MC. 1997. Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord [J]. *Dev Biol*, **183**(1): 37-48.

Goldstein AM, Fishman MC. 1998. Notochord regulates cardiac lineage in zebrafish embryos [J]. *Dev Biol,* **201**(2): 247-252.

Holland LZ, Laudet V, Schubert M. 2004. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology [J]. *Cell Mol Life Sci,* **61**(18): 2290-2308.

Huang GH. 2007.Primary Studies on the Defense against the Bacteria Infection and the Primitive Adaptive Immune System of Amphioxus[D]. Ph.D. thesis, Sun Yat-sen University, Guangzhou, China. [黄功华. 2007. 文昌鱼抗细菌感染的免疫学机制和原始适应性免疫的初步研究. 博士学位论文, 中山大学.].

Kozak M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes [J]. ***Cell.*** **44**(2): 283-92.

Kusakabe R, Kusakabe T, Satoh N, Holland ND, Holland LZ. 1997. Differential gene expression and intracellular mRNA localization of amphioxus actin isoforms throughout development: Implications for conserved mechanisms of chordate development [J]. *Dev Genes Evol,* **207**(4): 203-215.

Liang KL, Lin YS, Zhang YJ, Chen ZK, Zhang PJ, Zhang HW. 2004. Developmental expression of amphioxus GABA A receptor-associated protein-like 2 gene [J]. *Dev Genes Evol,* **214**(7): 339-341.

Lin YS, Chen DY, Zhang W, Cai ZP, Chen ZK, Zhang N, Mao BY, Zhang HW. 2011. Characterization of the immune defense related tissues, cells, and genes in amphioxus [J]. *Sci Chn: Life Sci,* 2011, **54**(11): 999-1004. [林浴霜, 陈冬艳, 张伟, 蔡召平, 陈忠科, 张宁, 毛炳宇, 张红卫. 2011. 文昌鱼免疫防御相关组织、细胞及基因研究. 中国科学: 生命科学, **41**(12): 1155-1161.]

Lohr JL, Danos MC, Yost HJ. 1997. Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development [J]. *Development,* **124**(8): 1465-1472.

Meedel TH, Farmer SC, Lee JL. 1997. The single MyoD family gene of *Ciona intestinalis* encodes two differentially expressed proteins: implications for the evolution of chordate muscle gene regulation [J]. *Development,* **124**(9): 1711-1721.

Mei WY, Ding XY. 1999. The formation of skeletal muscle in vertebrate embryos [J]. *Bull Life Sci,* **11**(1): 14-17. [梅文燕, 丁小燕. 1999. 脊椎动物胚胎骨骼肌的生成. 生命科学, **11**(1): 14-17.]

Munsterberg AE, Lassar AB. 1995. Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic *bHLH* gene expression in the somite [J]. *Development,* **121**(3): 651-660.

Pieples K, Arteaga G, Solaro RJ, Grupp I, Lorenz JN, Boivin GP, Jagatheesan G, Labitzke E, DeTombe PP, Konhilas JP, Irving TC, Wieczorek DF. 2002. Tropomyosin 3 expression leads to hypercontractility and attenuates myofilament length-dependent Ca^{2+} activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* **283**(4): H1344-H1353.

Pourquié O, Coltey M, Teillet MA, Ordahl C, Le Douarin N M. 1993. Control of dorsoventral patterning of somitic derivatives by notochord and floor plate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **90**(11): 5242-5246.

Satoh N. 2003. The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics [J]. *Nat Rev Genet,* **4**(4): 285-295.

Schubert M, Meulemans D, Bronner-Fraser M, Holland LZ, Holland ND. 2003. Differential mesodermal expression of two amphioxus *MyoD* family members (*AmphiMRF1* and *AmphiMRF2*) [J]. *Gene Expr Patterns,* **3**(2): 199-202.

Simon JR, Konieczny SF. 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family [J]. *Genes Dev,* **3**(12B): 2050-2061.

Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. 1989. Myogenin, a regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD [J]. *Cell,* **56**(4): 607-617.

Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J, Jessell TM. 1991. Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord [J]. *Cell,* **64**(3): 635-647.

Yamada T, Pfaff SL, Edlund T, Jessell TM. 1993. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate [J]. *Cell,* **73**(4): 673-686.

Yun KS, Wold B. 1996. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context [J]. *Curr Opiniona Cell Biol,* **8**(6): 877-889.

Zhang YJ, Mao BY. 2009. Developmental expression of an amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) gene encoding a GATA transcription factor [J]. *Zool Res,* **30**(2): 137-143.